



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

“INACTIVACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae* y
Leuconostoc spp EN JUGO DE MANZANA CLARIFICADO
COMERCIAL UTILIZANDO ONDAS DE CHOQUE”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

JUAN ANTONIO ESPINOZA SÁNCHEZ

DIRIGIDA POR

Dra. SOFIA MARIA ARVIZU MEDRANO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2015.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“INACTIVACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae* y
Leuconostoc spp EN JUGO DE MANZANA CLARIFICADO
COMERCIAL UTILIZANDO ONDAS DE CHOQUE”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

JUAN ANTONIO ESPINOZA SÁNCHEZ

DIRIGIDA POR

Dra. MARIA SOFIA ARVIZU MEDRANO

SINODALES

Dra. SOFIA MARIA ARVIZU MEDRANO

DIRECTOR

Dr. ACHIM M. LOSKE MEHLING

SINODAL

Dra. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA

SINODAL

M.en C. BEATRIZ LILIANA ÁLVAREZ MAYORGA

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
RESUMEN	
1.ANTECEDENTES	1
1.1 Consumo de néctares y jugos en México	1
1.2 Jugo de manzana	2
1.3 Proceso de elaboración del jugo de manzana	2
1.4 Deterioro del jugo de manzana	4
1.4.1 <i>Leuconostoc</i> spp	5
1.4.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
1.5 Tratamientos empleados en la industria para conservar el jugo de manzana	7
1.6 Nuevas tecnologías de conservación de los alimentos	8
1.6.1 Altas presiones hidrostáticas	9
1.6.2 Campos eléctricos pulsados	9
1.6.3 Irradiación	10
1.6.4 Ondas de choque	11
2.OBJETIVOS	15
2.1 General	15
2.2 Específicos	15

3.METODOLOGÍA	16
3.1 Materiales y equipos	16
3.1.1 Reactivos y medios de cultivo	16
3.1.2 Microorganismos	17
3.1.3 Jugo de manzana clarificado comercial	17
3.2 Métodos	18
3.2.1 Análisis fisicoquímicos y microbiológicos del jugo de manzana clarificado comercial.	18
3.2.2 Evaluación del desarrollo de <i>Leuconostoc</i> spp. y <i>S. cerevisiae</i> . en jugo de manzana clarificado y sin conservadores.	19
3.2.3 Evaluación del efecto de las ondas de choque sobre las células de <i>Leuconostoc</i> spp y <i>S. cerevisiae</i> .	20
4.RESULTADOS	22
4.1 Determinación de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del jugo de manzana clarificado comercial.	22
4.2 Aislamiento y selección cepas de levaduras y bacterias lácticas con capacidad para desarrollar en jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores.	25
4.3. Efecto de la aplicación de ondas de choque sobre <i>Leuconostoc</i> spp. y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en solución salina y jugo de manzana clarificado comercial.	33
4.3.1. Efecto de la aplicación de ondas de choque sobre <i>Leuconostoc</i> spp. y <i>S. cerevisiae</i> en solución salina	34
4.3.2. Influencia del número de impulsos de ondas de choque sobre <i>Leuconostoc</i> spp. y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> resuspendidos en jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores.	36

5.DISCUSIÓN	38
6.CONCLUSIÓN	40
7.REFERENCIAS	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principio de focalización de la onda de choque utilizando un elipsoide rotacional. La onda de choque esférica primaria se generan en el primer foco y se transforma mediante reflexión en una onda esférica convergente que se concentra en el segundo foco.	12
2	Esquema de un generador electrohidráulico de ondas de choque, la descarga eléctrica se da en F1 y la muestra se coloca en F2.	13
3	Variaciones de presión provocadas por el paso de una onda de choque.	14
4	Concentración de sólidos solubles de 5 marcas de jugos de manzana clarificado sin conservadores.	23
5	Valores de acidez titulable expresada como porcentaje de ácido málico de 5 marcas de jugos de manzana clarificado sin conservadores.	24
6	Nivel de pH de 5 marcas de jugo de manzana clarificado sin conservadores.	25
7	Dinámica de crecimiento de la bacteria ácido láctica 28 en 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores (pH 3.5) a 30°C por 48 horas.	27
8	Dinámica de crecimiento de la bacteria ácido láctica 54 en 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores (pH 3.5) a 30°C por 48 horas.	28
9	Dinámica de crecimiento de la bacteria ácido láctica 55 en 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores (pH 3.5) a 30°C por 48 horas.	29
10	Dinámica de crecimiento de la levadura H11 en 5 marcas de jugo	30

	de manzana clarificado comercial sin conservadores (pH 3.5) a 30°C por 48 horas.	
11	Dinámica de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores (pH 3.5) a 30°C por 48 horas.	31
12	Dinámica de crecimiento de <i>Saccharomyces Bayanus</i> en 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores (pH 3.5) a 30°C por 48 horas.	32
13	Dinámica de crecimiento de <i>Leuconostoc</i> spp en 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores (pH 3.5) a 30°C por 48 horas.	33
14	Efecto del número de ondas de choque y luz generada en <i>Leuconostoc</i> spp. y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> resuspendidos en solución salina isotónica.	35
15	Efecto del número de ondas de choque y luz generada en <i>Leuconostoc</i> spp. y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> resuspendidos en jugo de manzana.	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Efectos principales del tratamiento de alta presión en los alimentos.	10
2	Concentración de poblaciones microbianas de 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores.	26
3	Análisis de varianza del efecto de luz, dosis de ondas de choque y microorganismo sobre la inactivación lograda.	35

RESUMEN

El jugo de manzana es muy demandado. Para alargar su vida de anaquel y reducir riesgos microbianos, se emplea la pasteurización. La calidad de los jugos se pierde por acciones microbianas, enzimáticas, químicas y físicas. Durante la elaboración de los jugos, las levaduras y BAL son los contaminantes más comunes. Por esto se están empleando nuevas tecnologías de conservación que mantengan las características sensoriales, nutricionales del jugo y que aseguren su inocuidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar las ondas de choque para inactivar *S. cerevisiae* y *Leuconostoc* spp en jugo de manzana. Los ensayos fisicoquímicos nos indicaron que el 83.2% de las marcas de jugo manzana analizadas cumplen con los parámetros que establecen las normas internacionales. El tratamiento de 150 y 350 ondas de choque en solución salina en ausencia de luz no presentó una reducción considerable para los microorganismos analizados. En solución salina el tratamiento con ondas de choque en presencia de la radiación UV y visible que emite la descarga eléctrica que se usa para generar cada onda de choque arrojó resultados favorables siendo el *Leuconostoc* spp el más sensible. En presencia de luz se lograron reducir 0.7227 y 3.6495 logaritmos al aplicar 150 y 350 ondas de choque respectivamente. Los resultados del tratamiento con 350 y 1000 ondas de choque en presencia de la radiación mencionada en jugo de manzana dieron resultados inesperados: la reducción de *Leuconostoc* y *S.Cerevisiae* fue casi nula. El daño subletal del tratamiento de ondas de choque puede ser probado con otros tratamientos para asegurar la calidad del jugo de manzana.

Palabras clave: bacterias ácido lácticas

1 ANTECEDENTES

1.1 Consumo de néctares y jugos en México

En la actualidad el ritmo de vida es altamente dinámico y la población rara vez tiene tiempo de preparar alimentos en sus casas. Ante esta situación lo que busca es encontrar sus satisfactores originales en otros productos que no requieran tiempo de preparación. Así por ejemplo, al no tener la posibilidad de hacer jugos de frutas naturales se busca el sustituto más cercano; en este caso los jugos y néctares envasados. Los consumidores de jugos y néctares principalmente buscan nutrientes específicos, como vitaminas y fibra, adicionalmente de características como un olor, sabor y presentación del producto agradables. Dado que no existe una norma que señale los estándares que deben cumplir dichos productos, en el mercado se comercian tanto jugos y néctares que cumplen con las características nutricionales mínimas, así como “supuestos jugos y néctares” que no se ajustan a los estándares de calidad. La Norma Mexicana (NMX) F-045-1982 solo menciona que estos productos deben de cumplir con las siguientes especificaciones fisicoquímicas: sólidos solubles, acidez titulable expresada en ácido málico y pH.

Según datos del Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, INEGI, desde el año de 1996 hasta el año 2002, la industria mexicana de los jugos ha presentado un crecimiento continuo en el volumen de producción. La mayor tasa de crecimiento anual en 1998, que fue de 16%. A partir, del año 2003, la producción de jugos presentó altibajos, logrando una ligera recuperación en el año 2004, con un volumen de 710 millones de litros. El consumo per cápita de jugo es en promedio de 7.2 litros. En lo que respecta a la producción de jugos en México el jugo de manzana representa un 18% de producción seguido por jugos de otras frutas tales como el mango, naranja y durazno. (SAGARPA, 2010)

1.2 Jugo de manzana

La Norma Mexicana (NMX) F-045-1982 define el jugo de manzana como producto alimenticio, líquido obtenido de la expresión de manzanas (*Pyrus Malus*) maduras, sanas, limpias, finamente divididas y tamizadas; sin diluir, ni fermentar, adicionado con edulcorantes nutritivos y aditivos alimenticios permitidos envasados en recipientes herméticamente cerrados y sometido a un proceso térmico que asegure su conservación.

Esta misma norma establece la clasificación y denominación del jugo de manzana, así como las especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas que debe reunir el producto. Contiene además métodos de prueba para verificar las especificaciones físicas, químicas y microbiológicas, nos proporciona también la información que debe contener el producto como son el marcado, etiquetado, envase y embalaje.

1.3 Proceso de elaboración del jugo de manzana

El proceso de elaboración está influenciado por el nivel de tecnificación de la empresa productora. De forma general, el proceso de obtención del jugo consiste en:

Molienda: La fruta es ingresada a una tina donde es lavada y sube por una cinta transportadora hacia mesa de selección donde se desecha la fruta en mal estado. El agua de la tina se renueva cada 8 hrs. El molino tritura la fruta entera por medio de martillos.

Prensado: La pulpa molida y tratada con enzima ingresa a Decanter (1ª extracción) y luego a prensas neumáticas (2ª extracción) donde se le adiciona condensado para extraer la mayor cantidad de jugo, el cual es preconcentrado para continuar con el proceso.

Pasteurización: Al jugo crudo obtenido por el prensado se le da un golpe térmico entre 90 - 93 °C por 15 segundos, luego se le baja la temperatura hasta 50 – 55°C y se acumula en estanques de tratamiento para su posterior clarificación. Este incremento de temperatura se aplica para inhibir enzimas oxidasas, eliminar casi la totalidad de los microorganismos presentes y desnaturalizar proteínas.

Clarificación: En esta etapa primero se adicionan enzimas pectinasa y amilasa para eliminar pectina y almidón en el jugo. El proceso de clarificación consiste en la adición de gelatina, bentonita, carbón activado y sílica de acuerdo a dosis y tiempos dados por laboratorio para lograr una separación de jugos claros y turbios. Una vez aplicada la mezcla al jugo, hay que dejar en reposo el estanque alrededor de 5 horas.

Filtración: Posteriormente al decantado del jugo, la parte clara pasa a filtración (filtro de vacío, filtro de presión y/o ultra filtración).

Concentración: El jugo filtrado es almacenado en un estanque que alimenta el equipo concentrador donde por efecto de T° y vacío se evapora el agua del jugo para aumentar los grados brix de 10 – 14° hasta los 70 – 71 grados brix.

Envasado: El jugo concentrado, homogenizado y analizado en el laboratorio es envasado en tambores de 55 o 60 gls, para posteriormente ser guardado en cámara de frío hasta su venta (JUGOSA, 2006).

Durante el proceso de elaboración puede presentarse oportunidad de ingreso de microorganismos patógenos o deterioradores, particularmente posterior al proceso de pasteurización.

1.4 Deterioro del jugo de manzana

Los microorganismos causantes de deterioro se agrupan de manera convencional en función de la acidez que desarrollan en el alimento, a su carácter mesófilo o termófilo, o bien aerobio, anaerobio o anaerobio facultativo (Fernández, 2008). El jugo de manzana es un alimento ácido (pH 4.6 o menor). Los microorganismos implicados en su deterioro son levaduras y bacterias no esporuladas (BAL) y son asociados a un subprocesamiento del producto.

En la microflora del jugo de manzana predominan las levaduras. Generalmente no se tiene en cuenta que una serie de levaduras de bajo poder fermentativo (por ej., *Kloeckera apiculata*) se encuentran dentro de la pulpa y que llegan a multiplicarse hasta $4,5 \times 10^4$ células/g en frutas almacenadas. Pueden asimismo encontrarse un número significativo de bacterias ácido tolerantes en la superficie del fruto (Beech, 1993).

Los equipos de molienda y prensado que no se limpien diariamente son la mayor causa de inoculación de microorganismos de forma que un jugo recién prensado puede contener 10^6 levaduras/ml. La fermentación comienza, por tanto, en pocas horas si los jugos no se mantienen refrigerados o se elaboran rápidamente, pero se evita con los procedimientos habituales de pasteurización que eliminan las levaduras. Las esporas de mohos pueden alcanzar 10^5 /ml y son más resistentes al calor que las levaduras (Beech y Carr, 1977).

El deterioro causado por los microorganismos aumenta sensiblemente si baja la acidez y, por ello, los jugos de manzana deben llevarse a un pH inferior a 3,8 antes de ser envasados. Las características fisicoquímicas de los jugos de frutas concentrados (bajo pH, bajo a_w , elevada viscosidad, escasa disponibilidad de oxígeno) sumado a la pasteurización hacen que la mayoría de los microorganismos patógenos y/o alterantes se vean inhibidos en su desarrollo (Parish y Higgins, 1989).

Las levaduras, los hongos y las bacterias ácido lácticas se han detectado como causantes del deterioro de jugos de fruta (Deak y Beuchat, 1993). Una de las bacterias ácido lácticas (BAL) más importantes en el deterioro de jugo de manzana es el *Leuconostoc*, este se encuentran comúnmente en las plantas (Johannin y col., 2007).

En los concentrados de jugo de manzana, las levaduras osmófilas como *Zygosaccharomyces rouxii* y *Z. bailii* fermentan lentamente los concentrados almacenados. Estos microorganismos se hallan especialmente en la superficie del jugo concentrado, donde algo de vapor de agua condensado provoca una ligera dilución. No es este sólo el problema, sino que pueden constituir un inóculo resistente a los conservantes (aunque no al calor) en las bebidas diluidas si la contaminación se produce en la fase final de la elaboración (Ashurst, 1995). Por tanto, para la producción de jugo es necesaria la mayor higiene posible durante la cosecha de la fruta.

1.4.1 *Leuconostoc* spp

Las bacterias ácido lácticas (BAL), como *Leuconostoc*, juegan un papel importante en la fermentación de diversos productos alimenticios principalmente lácteos, pero en muchos otros productos alimenticios como el jugo de manzana, el *Leuconostoc* afecta las características sensoriales del jugo.

El género *Leuconostoc*, está ampliamente distribuido en plantas, productos lácteos y otros productos alimenticios. *Leuconostoc mesenteroides* es un microorganismo Gram positivo, de morfología cocoide, anaerobio facultativo, no móvil y no formador de esporas (Bou y col., 2008).

El *Leuconostoc mesenteroides*, se desarrolla en un rango de temperatura de 10-37 °C, siendo la óptima 20 - 30 °C. En cuanto a la velocidad de crecimiento, *L.*

mesenteroides subsp mesenteroides presenta un tiempo de generación más corto que otras subespecies y un buen crecimiento puede ser obtenido en 24 horas a una temperatura de 30 °C. Cuando *L. mesenteroides* crece en medio de cultivo líquido es frecuente observar una importante y uniforme turbidez debido a la formación de largas cadenas celulares que tienden a sedimentar (Rodríguez, 2003).

Estas bacterias intervienen en los procesos de alteración de los alimentos por la fermentación de azúcares, formando ácido láctico y CO₂ (microorganismo heterofermentativo) que desencadenan en la caída del pH y en la aparición de olores y sabores extraños. Este hecho afectara a los atributos sensoriales y al grado de aceptación del producto, provocando importantes pérdidas económicas en las industrias alimentarias.

1.4.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras se encuentran en la mayoría de las frutas, las flores y en los exudados de las plantas. Estas levaduras fermentan los azúcares, produciendo CO₂ y etanol (Ingraham, 1998).

Saccharomyces cerevisiae es una levadura importante en la industria alimentaria ya que se utiliza en el proceso de fabricación de pan, vino y cerveza principalmente, su presencia en otros productos afecta su calidad debido a la descomposición de algunos alimentos, tales como jugos de fruta, provocando importantes pérdidas económicas. En general, las levaduras son responsables del deterioro de los alimentos con pH bajo y alto nivel de azúcar o de alto contenido de sal (Marx, 2011).

Son esféricas, elípticas o cilíndricas y su tamaño varia notablemente, pero el diámetro de *Saccharomyces cerevisiae* oscila entre 2 y 8 micras y no contiene flagelos u órganos de locomoción. Su pared celular está integrada por polímeros de glucosa y manosa, con cantidades pequeñas de proteínas, lípidos y quitina. La

temperatura óptima de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* es de 30 a 35 °C. El pH óptimo para la mayoría de las levaduras se encuentra en un rango de 4 a 6 (Nieto, 2009).

1.5 Tratamientos empleados en la industria para conservar el jugo de manzana

Desde sus inicios, el principal objetivo de la industria alimentaria ha sido la búsqueda de métodos de conservación que alarguen la vida útil de los productos evitando la acción de agentes que alteren sus propiedades. Las tecnologías de conservación más populares para la reducción de la contaminación microbiana de los alimentos y los patógenos en particular, han sido la manipulación de la actividad de agua y / o pH, tratamientos térmicos, la adición de conservantes químicos, y el control de la temperatura de almacenamiento de los alimentos.

El jugo de manzana es un producto alimenticio que se altera rápidamente por la acción de distintos agentes, principalmente por enzimas propias de la fruta y especialmente por microorganismos. Las técnicas de conservación no solo tienen que asegurar la estabilidad del producto, sino que también tienen como objetivo inactivar o inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos a concentraciones suficientes para producir la enfermedad, es decir garantizar su inocuidad.

Existen varias tecnologías que se aplican en la conservación de jugos de manzana que inactivan agentes patógenos y deterioradores:

Pasteurización lenta: el jugo recibe un tratamiento térmico de 65 °C durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, la operación se completa con el enfriamiento rápido del producto hasta una temperatura de 5 °C, a fin de producir un choque térmico que inhibe el crecimiento de los microorganismos que pudieran haber sobrevivido al tratamiento térmico previo.

Pasteurización HTST (high temperature, short time): se trabaja a temperaturas altas (72-85 °C) y tiempos cortos (entre 15-20 segundos), utilizando intercambiadores de calor de placas, esta pasteurización es más rápida y de consumo energético reducido, el producto obtenido presenta poca alteración de las propiedades organolépticas.

Pasteurización UHT (ultra-high temperature): Consiste en exponer el jugo durante un corto tiempo (de 2 a 4 segundos) a una temperatura que oscila entre 135 y 140 °C y seguido de un rápido enfriamiento, no superior a 32 °C. La alta temperatura reduce el tiempo del proceso, y de esta manera se reduce también la pérdida de nutrientes.

Por tanto el calor es el principal método de inactivación de los microorganismos y enzimas de los jugos, permitiendo obtener un alimento seguro y estable. Además, a algunos jugos se les añaden sustancias ácidas y aditivos con actividad antimicrobiana que refuerzan la conservación del producto.

1.6 Nuevas tecnologías de conservación de los alimentos

Para satisfacer la demanda de los consumidores, el principal objetivo de la industria alimentaria es desarrollar nuevos métodos de conservación no térmicos capaces de generar productos estables, seguros y sin alterar sus características nutricionales.

Últimamente, y principalmente como resultado de la demanda de "productos frescos", otras tecnologías se están convirtiendo en alternativas de ampliación de la vida útil del producto (productos de mejor calidad) y la reducción de organismos patógenos. Entre las nuevas tecnologías de conservación de alimentos destacan las altas presiones hidrostáticas, campos eléctricos pulsados e irradiación. Sin embargo, se están estudiando otras tecnologías que se encuentran en etapa de investigación o de desarrollo, para su aplicación comercial. Una de estas nuevas tecnologías son las ondas de choque (CRFSFS, 2003).

1.6.1 Altas presiones hidrostáticas

Se entiende por alta presión la tecnología con la que se tratan los materiales a presiones entre los 100 y 1000 MPa, con un tiempo de aplicación que puede oscilar entre unos pocos minutos a algunas horas y a una temperatura de tratamiento que puede ir de los -20 a los 90 °C. Puesto que el medio utilizado para transmitir la presión suele ser agua, el tratamiento de altas presiones también suele llamarse alta presión hidrostática (APH). Al incrementar la presión se produce un descenso en el volumen del agua, pero muy pequeño en comparación con el descenso de volumen que pueden experimentar los gases (Raventos, 2003).

La principal ventaja de esta tecnología es que puede realizarse a temperatura ambiente, conservando los parámetros de calidad del producto original. Cuando un alimento es sometido a altas presiones se observan principalmente los siguientes efectos: modificación del volumen del sistema, modificación de la estructura del almidón y las proteínas, modificación de la actividad enzimática e inactivación de los microorganismos (Cuadro 1).

1.6.2 Campos eléctricos pulsados

El tratamiento con campos eléctrico pulsados se basa en colocar el producto en una cámara que contiene dos electrodos. Al producto se le suministran pulsos eléctricos de alto voltaje. El tratamiento se realiza a una temperatura determinada y por un tiempo definido. Los pulsos aplicados a los alimentos van de 20 a 80 kV/cm. Este tratamiento reduce los cambios organolépticos y nutricionales del alimento, debido a que el tratamiento se realiza en poco tiempo y a una temperatura a la que no se ven afectadas considerablemente las características del producto.

Cuadro 1. Efectos principales del tratamiento de alta presión en los alimentos (Raventos, 2003).

Presión (MPa)	Efectos
>200 MPa	Influencia sobre la cinética enzimática. Modificación de las propiedades físicas de las proteínas. Alteración de la membrana de los microorganismos.
>300 MPa	Inactivación enzimática irreversible. Muerte de los microorganismos.
>400 MPa	Gelificación de los almidones Desnaturalización de las proteínas.
>500MPa	Muerte de las esporas bacterianas. Inactivación de las enzimas

La aplicación de campos eléctricos causa la separación de la carga electrostática en la membrana celular del microorganismo, debido a la naturaleza bipolar de la misma. La acumulación de cargas positivas y negativas en la membrana celular crea un potencial de transmembrana. Estas cargas sufren una fuerza de atracción entre ellas que generan una presión de compresión en la membrana celular, causando la disminución del espesor de la misma. Si el campo eléctrico es lo suficientemente grande y se supera el potencial transmembrana crítico, se crean poros en la membrana celular produciéndose la lisis del microorganismo (Osorio, 2010).

1.6.3 Irradiación

Esta técnica de conservación de los alimentos se basa en el principio en el cual los alimentos adsorben cuantos de energía de radiación electromagnética. La radiación empleada es emitida de forma continua por ^{60}Co y ^{137}Cs . Estas fuentes de

radiaciones ionizantes se usan en alimentos por que no dejan residuos de radioactividad.

La radiación electromagnética adecuada para el tratamiento de productos alimenticios tiene una longitud de onda entre 10^3 y 10^{-1} nm. La dosis de radiación, o cantidad de energía de la radiación incidente absorbida por la materia irradiada, es medida en Gy o Rad (1Gy es la absorción de 1 J por Kg de materia irradiada), la irradiación de los alimentos se clasifica en tres categorías: dosis altas (>10 KGy), dosis medias (1-10 KGy), y dosis bajas (< 1 KGy) (Maraver, 2012).

1.6.4 Ondas de choque

Las ondas de choque aparecen en la atmosfera cuando ocurren explosiones, cuando hay relámpagos o cuando los aviones rompen la barrera del sonido. Las ondas de choque son ondas acústicas que se caracterizan por amplitudes de alta presión con respecto a la presión del medio ambiente. Pueden transmitir energía desde el lugar de su generación hasta áreas distantes (COMACIR, 2007).

En mecánica de fluidos, una onda de choque es una onda de presión abrupta producida por un objeto que se mueve en un medio a una velocidad superior a las ondas que produce y que a través de diversos fenómenos produce diferencias de presión extremas y aumento de la temperatura (Anderson, 2001).

Las ondas de choque consisten en un pulso de compresión seguido de un pulso de rarefacción (zonas de baja presión). La presión aumenta desde el valor de equilibrio hasta el máximo en unos cuantos nanosegundos. Después de aproximadamente uno a tres microsegundos disminuye a valores de hasta 30 MPa por debajo de la presión de equilibrio. Finalmente, algunas millonésimas de segundo más tarde se restablece la presión hidrostática (Zuñiga, 2012).

Para generar ondas de choque para aplicaciones biomédicas se usan tres principios diferentes: electrohidráulico, piezoeléctrico y electromagnético. Las ondas de choque se concentran utilizando generadores con geometría esférica, lentes acústicos o reflectores (Figura 1).

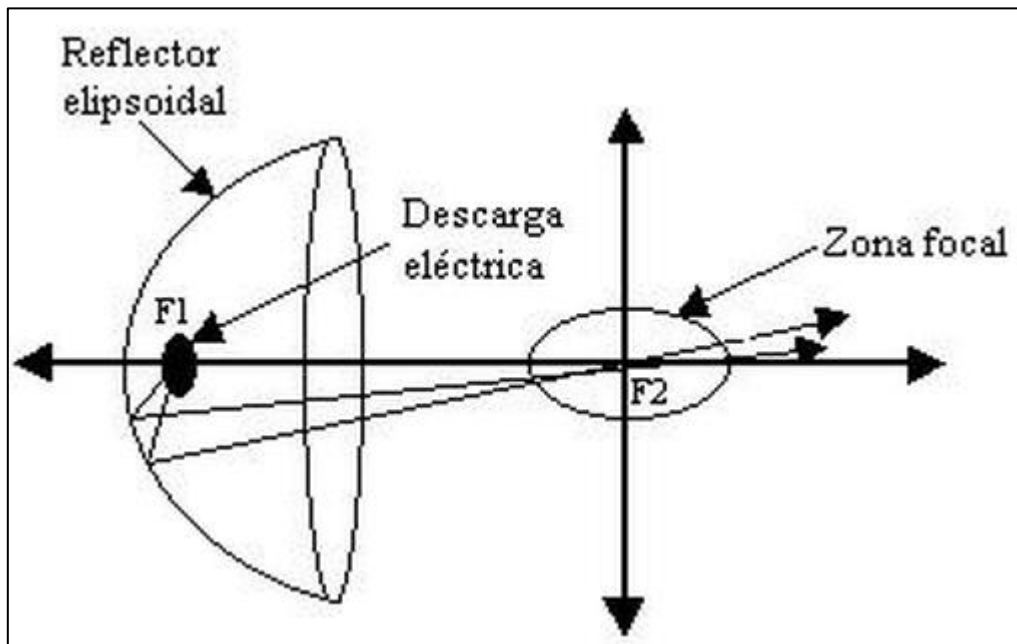


Figura 1. Principio de concentración de la onda de choque. La onda de choque esférica se genera en el primer foco y se transforma mediante reflexión en una onda esférica convergente que se concentra en el segundo foco (COMACIR, 2007).

En la figura 2 se muestra un esquema de la generación electrohidráulica de las ondas de choque. Las ondas de choque usadas en aplicaciones biomédicas son discontinuidades de presión (con una amplitud de pulso positivo de 150 MPa) que se propagan a través del agua (Figura 3). Cuando se da una descarga de alto voltaje (15 a 25 kV DC) a través de un par de electrodos inmersos en agua, se crea una burbuja de plasma de alta presión que se expande supersónicamente alrededor del fluido que la rodea produciendo una onda de choque esférica. La

amplitud de la presión y la energía de la onda de choque dependen de la descarga de alto voltaje (Loske, 2002).

Las ondas de choque provocan fenómenos secundarios, como la cavitación acústica, es decir, el crecimiento y colapso de pequeñas burbujas. En el caso del sistema electrohidráulico, la descarga de alto voltaje genera luz visible y ultravioleta (UV). La cavitación es producida por las microburbujas que se encuentran en el fluido. El radio típico de una burbuja de aire en un fluido es de $3\ \mu\text{m}$. El pico positivo de la onda de choque comprime las microburbujas contenidas en el fluido. Algunos microsegundos más tarde, el pico negativo hace que las microburbujas se expandan. Continúan creciendo hasta aproximadamente 200 a 600 μs después del paso de la onda de choque y finalmente colapsan violentamente, generando ondas de choque secundarias y microjets de alta velocidad (hasta 400 m/s).

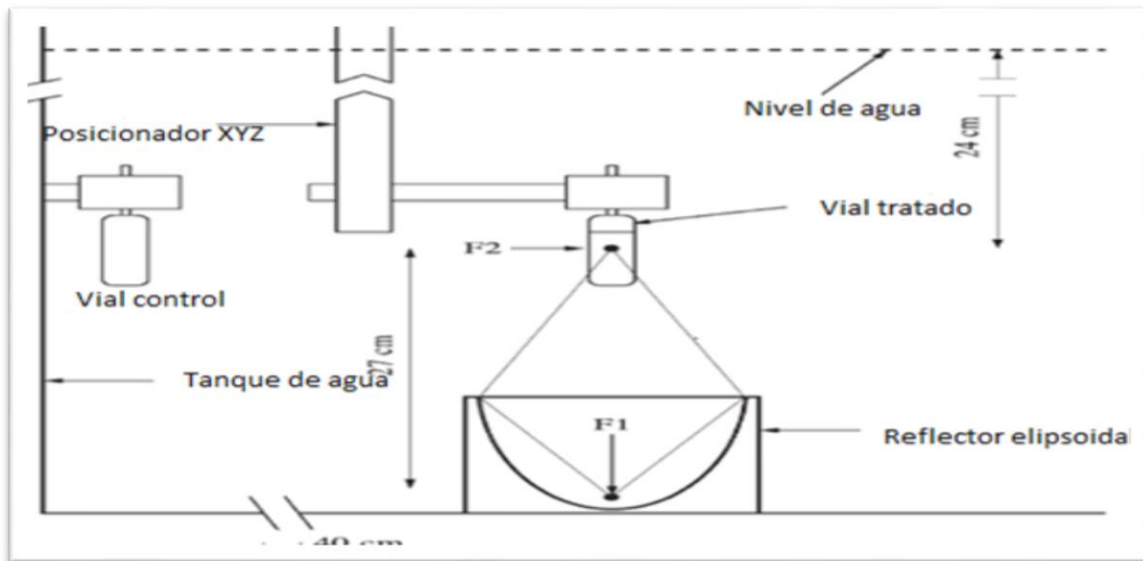


Figura 2. Esquema de un generador electrohidráulico de ondas de choque, la descarga eléctrica se da en F1 y la muestra se coloca en F2 (Loske, 2004)

En un generador piezoeléctrico un pulso de alto voltaje (5 - 10 kV) genera la súbita expansión de un gran número de cristales piezoeléctricos montados sobre una

superficie esférica. El arreglo de cristales está en contacto con agua a través de una membrana flexible. La expansión de cada cristal produce un pulso de presión en el agua. Las contribuciones de todos los cristales piezoeléctricos se superponen, de manera que en la vecindad del centro del arreglo (F) se genera una onda de choque.

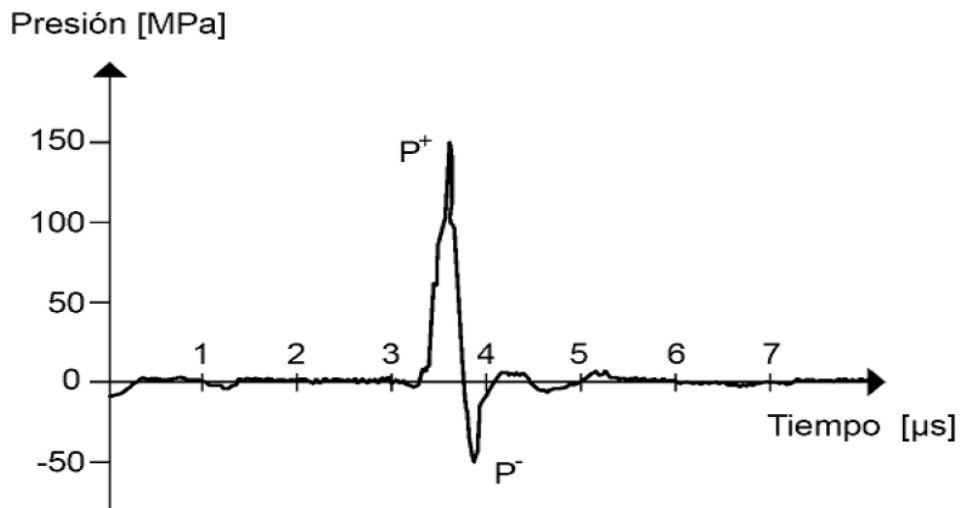


Figura 3. Variaciones de presión provocadas por el paso de una onda de choque (Zuñiga, 2012).

Varios estudios han demostrado que los mecanismos para inactivar bacterias son complejos y dependen de varios factores, como la presión, la cavitación y la luz visible y UV que se produce por la descarga eléctrica (Loske, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 General

Evaluar el efecto de la aplicación de las ondas de choque sobre la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae* y *Leuconostoc* spp en jugo de manzana clarificado comercial.

2.2 Específicos

- Seleccionar cepas de levaduras y bacterias lácticas con capacidad para desarrollar en jugo de manzana.
- Evaluar el efecto bactericida de las ondas de choque sobre *Saccharomyces cerevisiae* y *Leuconostoc* spp. en solución salina y en jugo de manzana clarificado comercial.

3 METODOLOGÍA

3.1 Materiales y equipos

Agitador mecánico, vortex®, Velp Scientifica®, ns/113123.

Autoclave eléctrica, Traun®, Mod. Certoclav CV 2000/l.

Autoclave eléctrica de mesa, Market-Forge®, Mod. 199-85.

Balanza analítica, Sartorius® BL 120 S, sensibilidad 0.0001 g.

Balanza analítica, Sartorius® TE3102S, sensibilidad 0.01 g.

Balanza granataria, OHAUS®, modelo CT200-S, sensibilidad 0.1 g.

Campana de flujo laminar, Alder®, Veco®.

Cuenta colonias, Quebec Reicher-Jung®.

Generador de ondas de choque piezoeléctrico, Richard Wolf GmbH®, Knittlingen, Alemania (Piezoson 100).

Generador de ondas de choque piezoeléctrico experimental (multifuncional).

Generador de ondas de choque electrohidráulico experimental (Mexilit II).

Incubadora (22 y 30 °C), Precision Scientific®, P Selecta®.

Incubadora (54°C), FX® Serie 920-008.

Material de uso común en el laboratorio de microbiología.

Micropipetas 1-1000 µl, Labsystems®, Brand®, Genex Beta®, Rainin®, Gilson®.

Microscopio optico, Axiostar plus®, Mod. 1169-149.

Olla de presión, Presto Steele®, 21y 12 L.

Potenciometro, Jenway®, 3510 pH Meter.

Refrigerador, OSEDA® Refrigeración.

Ultracentrifuga, Heraeus®.

3.1.1 Reactivos y medios de cultivo

Agar cuenta estándar (ACE), DIBICO®.

Agar Man Rogosa Sharpe (MRS), Difco®.

Agar Papa Dextrosa (ADP), DIBICO®.

Agar Soya Trypticaseína (AST), Bioxon®.
Caldo Man Rogosa Sharpe (CMRS), Difco®.
Caldo Papa Dextrosa (CPD), Difco®.
Caldo Soya Trypticaseína (CST), Bioxon®.
Diluyente de peptona (DP) (0.1% peptona de caseína), Bioxon®.
Fenolftaleína 1%, Baker®.
Hidroxido de sodio 0.1N, Merk®.
Jugo de manzana clarificado comercial.
Solucion salina fisiológica (SSF)(0.85% NaCl), Merk®
Tampon de fosfatos (BP), JT Baker®.

3.1.2 Microorganismos

Leuconostoc spp: *Leuconostoc lactis* (20), *Leuconostoc mesenteroides* subsp *mesenteroides* (67), *Leuconostoc fallax* (74), *Leuconostoc* spp (75), *Leuconostoc lactis* (88).

Saccharomyces cerevisiae, *Saccharomyces Bayanus*, levadura 11 (aislada de la superficie de la manzana).

Las cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

3.1.3 Jugo de manzana clarificado comercial

Se utilizó jugo de manzana clarificado sin conservadores de cinco marcas, adquirido en puntos de venta de la ciudad de Querétaro durante el periodo de julio a noviembre del 2012. Para llevar a cabo los estudios de comportamiento, el jugo se centrifugó a 4500 rpm por 15 min, el sobrenadante se esterilizó por filtración (poro de tamaño 0.22µm) y se almacenó a 4°C hasta su uso (menos de una semana).

3.2 Métodos

3.2.1 Análisis fisicoquímicos y microbiológicos del jugo de manzana clarificado comercial.

3.2.1.1 Medición del pH

Se homogenizó el jugo dentro del empaque sin abrir y se transfirió una alícuota a un vaso de precipitados, se ajustó la temperatura a $25\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y se realizó la medición de pH, empleando un potenciómetro calibrado con las soluciones buffer de pH 4 y pH 7 (AOAC, 1990).

3.2.1.2 Acidez titulable

Se homogenizó el jugo y se transfirieron 10 ml de la muestra, se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 200 ml, se agregaron 4 gotas del indicador de fenolftaleína 1% y se tituló rápidamente con una solución de hidróxido de sodio al 0.1 N. La muestra se agitó con moderación después de cada adición de la solución de hidróxido de sodio hasta que la coloración de la solución permanezca (1 min) ligeramente. Los resultados se expresaron en mililitros de la solución de hidróxido de sodio a 0.1 N por gramos de ácido málico por cada 100ml de jugo de manzana (AOAC, 1990).

3.2.1.3 Medición de sólidos solubles

Se colocó en el refractómetro una muestra de agua destilada a 20°C a través del prisma, y se verificó la lectura de 0 grados Brix. Se limpió el refractómetro con alcohol y agua destilada antes de cada lectura. Se colocó una alícuota de jugo y se observó a contraluz para tomar la lectura directamente hasta observar un campo

visual donde se dividió en una zona luminosa y otra oscura. Los resultados se expresaron en grados Brix (AOAC, 1990).

3.2.1.4 Análisis microbiológicos

A partir del jugo de manzana comercial se cuantificaron las bacterias lácticas, bacterias mesófilas aerobias y levaduras. Se centrifugaron 5 ml del jugo de manzana clarificado comercial a 4500 rpm por 15 minutos en tubos estériles. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en un mililitro de solución tampón de fosfatos (pH 7.2). Se tomaron alícuotas por duplicado de 100 µl y se realizó la extensión en superficie en placas con agar MRS para las bacterias lácticas, AST pH 7 y agar cuenta estándar para bacterias mesófilas aerobias, AST pH 5 para bacterias mesófilas aerobias acidófilas y agar APD para levaduras. Se incubaron a 30° C por 48 horas para las bacterias y a 22°C por 72 horas para las levaduras. Posteriormente se realizaron el conteo de colonias y pruebas de identificación microscópica y bioquímica.

3.2.2 Evaluación del desarrollo de *Leuconostoc* spp. y *S. cerevisiae*. en jugo de manzana clarificado y sin conservadores.

3.2.2.1 Preparación de inóculo

Las cepas de *Leuconostoc* spp se activaron mediante dos resiembras sucesivas en CMRS a 30 °C por 24 horas y *S.cerevisiae* en CPD a 22° C por 48 horas. De cada cepa se tomó un mililitro del cultivo activado, se centrifugó a 4500 rpm por 15 minutos, se decantara el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en SSF estéril, el lavado celular se realizó dos veces. Posteriormente cada paquete celular se resuspendió en un mililitro de jugo de manzana, que previamente antes del tratamiento se almaceno a 15 °C por 20 min. En el caso de la bacteria se prepararon mezclas equitativas de cinco cepas de *Leuconostoc*: *Leuconostoc lactis*

(20), *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides* (67), *Leuconostoc fallax* (74), *Leuconostoc spp* (75), *Leuconostoc lactis* (88).

Para seleccionar las cepas de *Leuconostoc spp* y *S. cerevisiae* con mayor capacidad de desarrollar en el jugo de manzana, se realizaron cinéticas de desarrollo empleando un analizador turbidimétrico automatizado Bioscreen® C. El jugo de manzana clarificado se colocó dentro de las fosas de una placa de plástico estéril. Se inocularon las cepas de *Leuconostoc spp* y *S. cerevisiae* de forma independiente. Las placas se introdujeron en el analizador y se incubaron a 30°C por 48 horas. Las placas se agitaron a intensidad media automáticamente cada 20 minutos por 5 segundos y se realizó la medición de la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 600 nanómetros. El control consistió en jugo de manzana sin inocular. Al finalizar el tiempo de incubación el aparato nos mostró automáticamente la DO máxima alcanzada y los tiempos de detección (TD) para cada una de las fosas de la placa.

3.2.3 Evaluación del efecto de las ondas de choque sobre las células de *Leuconostoc spp* y *S. cerevisiae*.

Las cepas de *Leuconostoc* (*Leuconostoc lactis* (20), *Leuconostoc mesenteroides subsp mesenteroides* (67), *Leuconostoc fallax* (74), *Leuconostoc spp* (75), *Leuconostoc lactis* (88) y *S. cerevisiae* se activaron como se mencionó anteriormente (3.2.2.1).

Se utilizó un generador electrohidráulico (Mexilit II) con un reflector elipsoidal de acero inoxidable (eje mayor = 27.8 cm, eje menor = 15.6 cm, profundidad = 12.4 cm). Se utilizaron bujías con electrodos en forma de cono truncado, las cuales se precalentaron con 100 descargas a 20 ± 0.1 kV. Se realizaron tratamientos a 150 y 350 ondas de choque con presencia y ausencia de la luz generada por la descarga de alto voltaje, es decir, bloqueando (o no bloqueando) la radiación proveniente de la descarga eléctrica. Como medio de tratamiento se empleó solución salina

isotónica y jugo de manzana, manteniendo constante la cavitación aumentada. Los tratamientos se realizaron a temperatura ambiente. Se utilizaron pipetas de transferencia de cuatro mililitros de capacidad, estas se llenaron hasta un 50 % con la muestra que se sometió al tratamiento. Una vez hecho esto las pipetas fueron selladas y colocadas verticalmente dentro de la tina del generador electrohidráulico de modo que el centro de la pipeta quedó alineado con el foco geométrico del generador de ondas de choque. El nivel de agua se mantuvo cinco centímetros por encima de la pipeta de transferencia que contiene la muestra. Las pipetas control se colocaron dentro de la tina fuera del foco de las ondas de choque, preferentemente en una de las esquinas de la tina, lejos del paso de las ondas de choque. Los recuentos de las células viables se realizaron por extensión en superficie en agar MRS y APD, incubando las placas por 48 horas y 72 horas a 30 °C y 22 °C para *Leucocostoc spp* y *S.cerevisiae*, respectivamente. La acción bactericida de las ondas de choque se definió como la diferencia entre el logaritmo de la población viable (UFC/mL) en las pipetas control (N_0) y el logaritmo de la población viable (UFC/mL) en viales tratados (N), es decir:

$$\text{Efecto bactericida de las ondas de choque} = \log(N_0) - \log(N) = \log(N_0/N)$$

4 RESULTADOS

4.1 Determinación de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del jugo de manzana clarificado comercial.

Se analizaron 25 muestras de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores de cinco marcas con el objetivo de aislar BAL y levaduras con capacidad de desarrollar en el alimento y seleccionar una marca que mostrara poca variabilidad en parámetros fisicoquímicos y cumpliera con los estándares de calidad de la norma NMX-F-045-1982 y CODEX STAN 247-2005. Los ensayos fisicoquímicos que se realizaron fueron determinación de sólidos solubles, acidez titulable y pH.

En la Figura 4 se muestran los valores promedio de los sólidos solubles contenidos en los jugos de manzana. El valor mínimo observado fue 10° Brix. Eisele y Drake (2005) al analizar la composición química del jugo de manzana natural consiguieron 14.24 °Brix. Por otra parte en el estudio de Yuste y Fung (2003) obtuvieron 11.48 + 0.02 °Brix en jugo de manzana pasteurizado comercial. CODEX-STAN 247 – (2005) sugiere que el jugo de manzana contenga como mínimo, 11.5 °Brix, por lo que se puede observar que las marcas M2 y M4 no siguieron la recomendación de la norma internacional. El contenido de sólidos solubles influye notablemente en el sabor de las frutas y es uno de los factores intrínsecos que favorece el crecimiento de las poblaciones de bacterias y mohos propios de la microflora, ya que estos sólidos están constituidos principalmente por azúcares de fácil asimilación para los microorganismos (Jay, 1992).

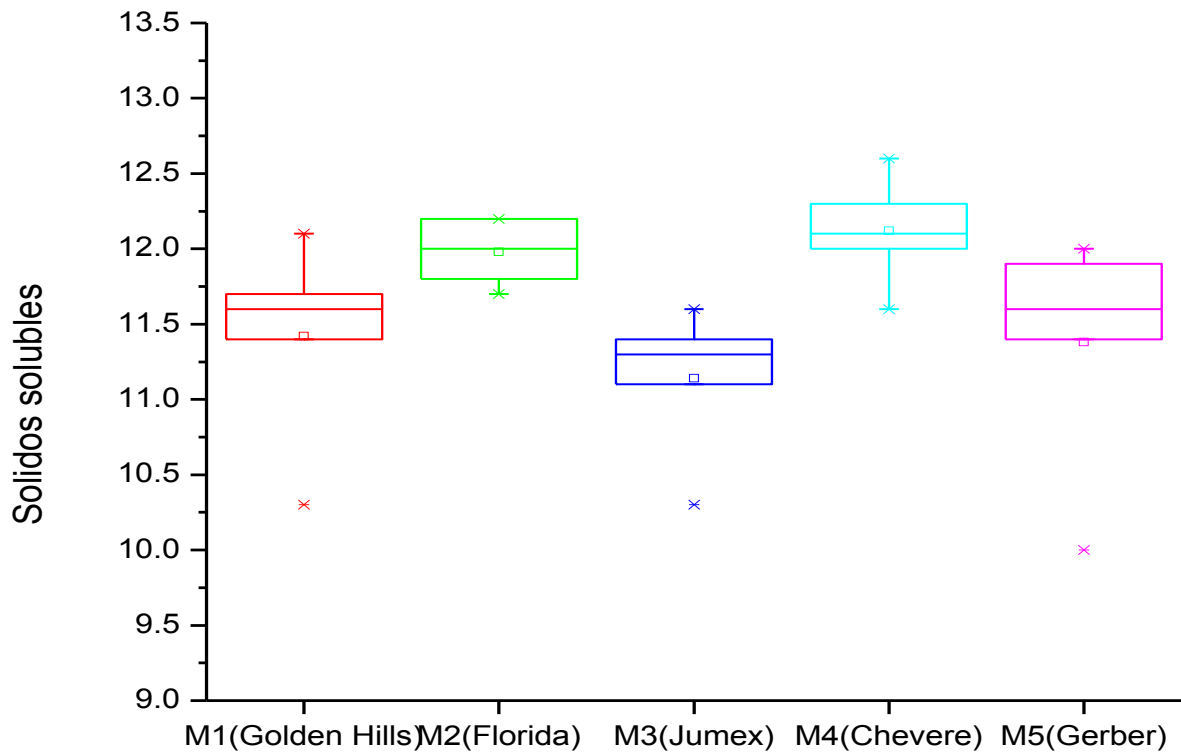


Figura 4. Concentración de sólidos solubles de 5 marcas de jugos de manzana clarificado sin conservadores.

Los valores de acidez titulable (expresada en porcentaje de ácido málico) de los jugos se observan en la Figura 5. Los límites que se observaron fueron de 0.19 y 0.77 (1.9 y 7.7 g/L). Estos datos varían con respecto a Eisele y Drake (2005) quienes reportan 0.87 (8.7 g/L) de valor promedio. La acidez valorable depende esencialmente del contenido en ácido L-málico, la cual comprende valores a 2.3-7.8 g/L, calculados como ácido málico a pH 8.1. En las frutas, la concentración de iones de hidrógeno y su variación puede relacionarse con los cambios que se producen durante el proceso de maduración de los frutos, en el cual ocurre una

disminución en la acidez total titulable y con esto, una disminución de la concentración de iones hidrógeno presentes (Laguado, 1995).

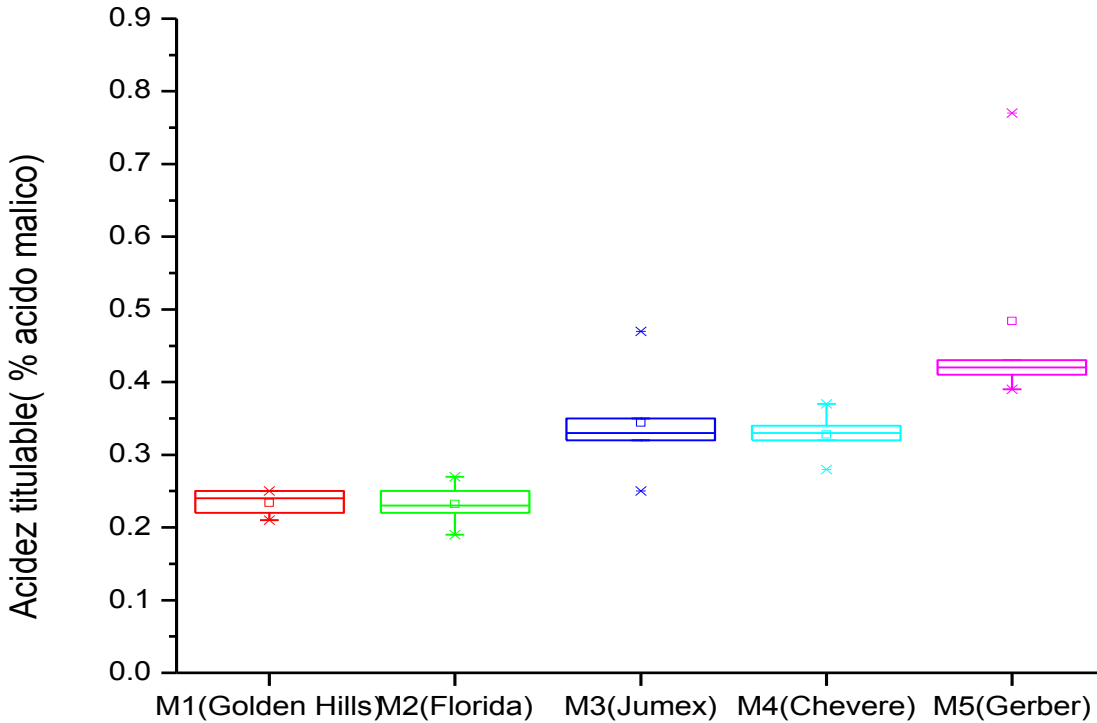


Figura 5. Valores de acidez titulable expresada como porcentaje de ácido málico de 5 marcas de jugos de manzana clarificado sin conservadores.

Como se observa en la Figura 6 el jugo de manzana presentó valores bajos de pH, el valor de pH mínimo fue de 3.1 y el máximo de 4.3. En 2005, Eisele y Drake reportaron un pH mínimo y máximo de 3.37 y 4.27. Yuste y Fung (2003) obtuvieron $3.64 + 0.17$ en jugo de manzana comercial. El pH resulta de la capacidad amortiguadora del conjunto de ácidos orgánicos predominantes en el sistema, además de la presencia de sales, proteínas y otros compuestos coloidales, que

permiten al sistema biológico conservar el pH, aun cuando haya pequeñas variaciones en la cantidad de ácidos o bases presentes, o por la adición de éstos.

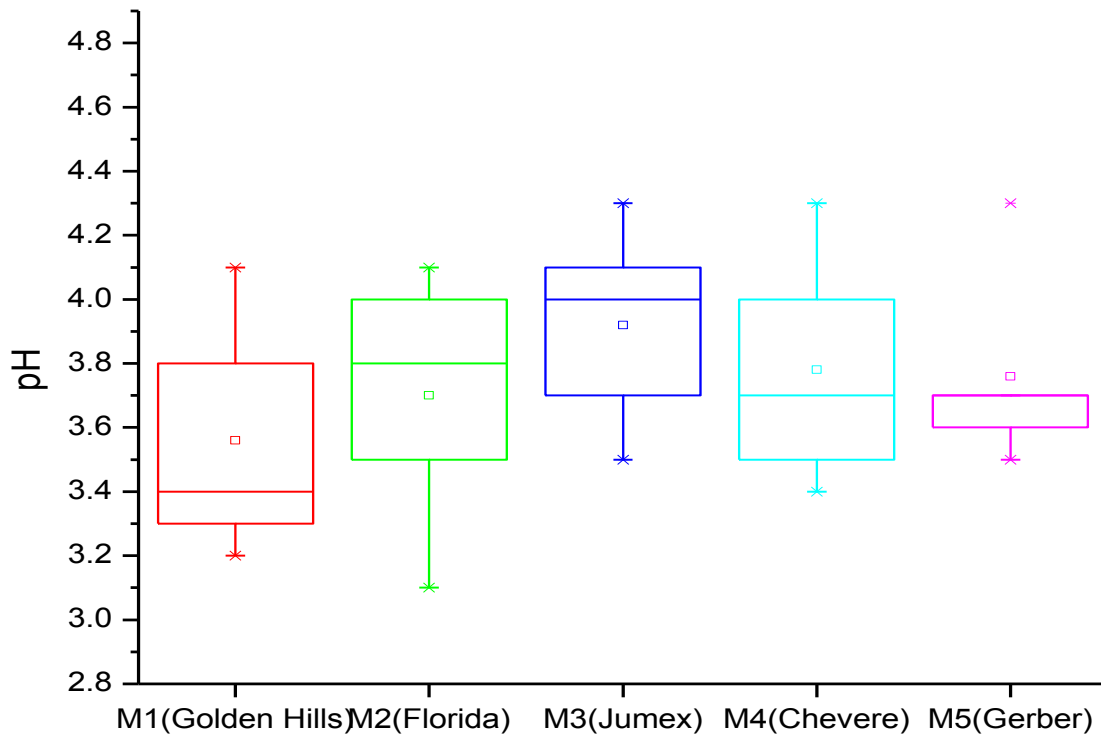


Figura 6. Nivel de pH de 5 marcas de jugo de manzana clarificado sin conservadores.

4.2 Aislamiento y selección cepas de levaduras y bacterias lácticas con capacidad para desarrollar en jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores.

Para este estudio se utilizaron 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores: Chévere, Florida, Golden Hills, Jumex y Gerber. De estos jugos se tomaron muestras de las cuales se aislaron microorganismos indicadores, las

bacterias mesofilas aerobias (BMA) predominan sobre los otros grupos indicadores y en el caso de las levaduras no se logró ningún recuento.

Las cepas aisladas de estos jugos se evaluaron morfológicamente y se seleccionaron aquellas cepas que fueron Gram positivas y catalasa negativo, los resultados se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Número de cepas aisladas de 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores en diferentes medios de cultivo.

Marca	BMA (AST pH 7)	BMA (ACE)	BMA (AST pH 5)	BAL (MRS)
Golden Hills	6	2	4	0
Florida	2	0	3	1
Jumex	4	9	1	0
Chevere	14	15	2	0
Gerber	12	6	1	0

Las cepas aisladas se identificaron como cepa 28, 54 y 55. Posteriormente el desarrollo de estas cepas aisladas del jugo de manzana, se incubaron por 48 horas en un analizador turbidimétrico automatizado. No se encontraron levaduras en ninguno de los jugos analizados. La cepa 28 de bacterias ácido lácticas aisladas, presento un buen desarrollo en la mayoría de los jugos utilizados, solo en el jugo de la marca florida no presento un desarrollo considerable.

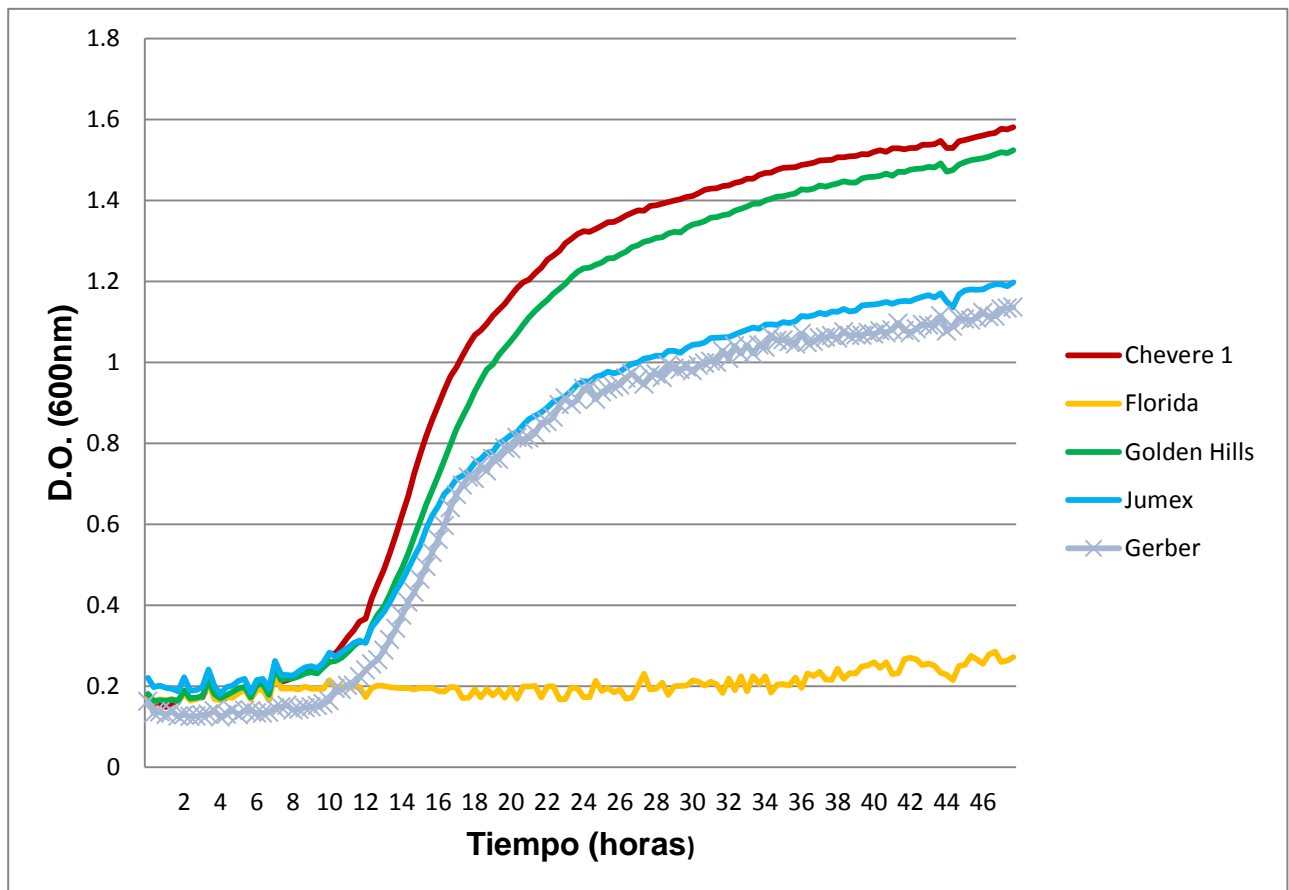


Figura 7. Dinámica de crecimiento de la bacteria ácido láctica 28 en 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores (pH 3.5) a 30°C por 48 horas.

Las bacterias ácido lácticas 54 y 55 no presentaron un desarrollo considerable en los jugos analizados, lo cual se puede observar en la figura número 8 y 9 respectivamente.

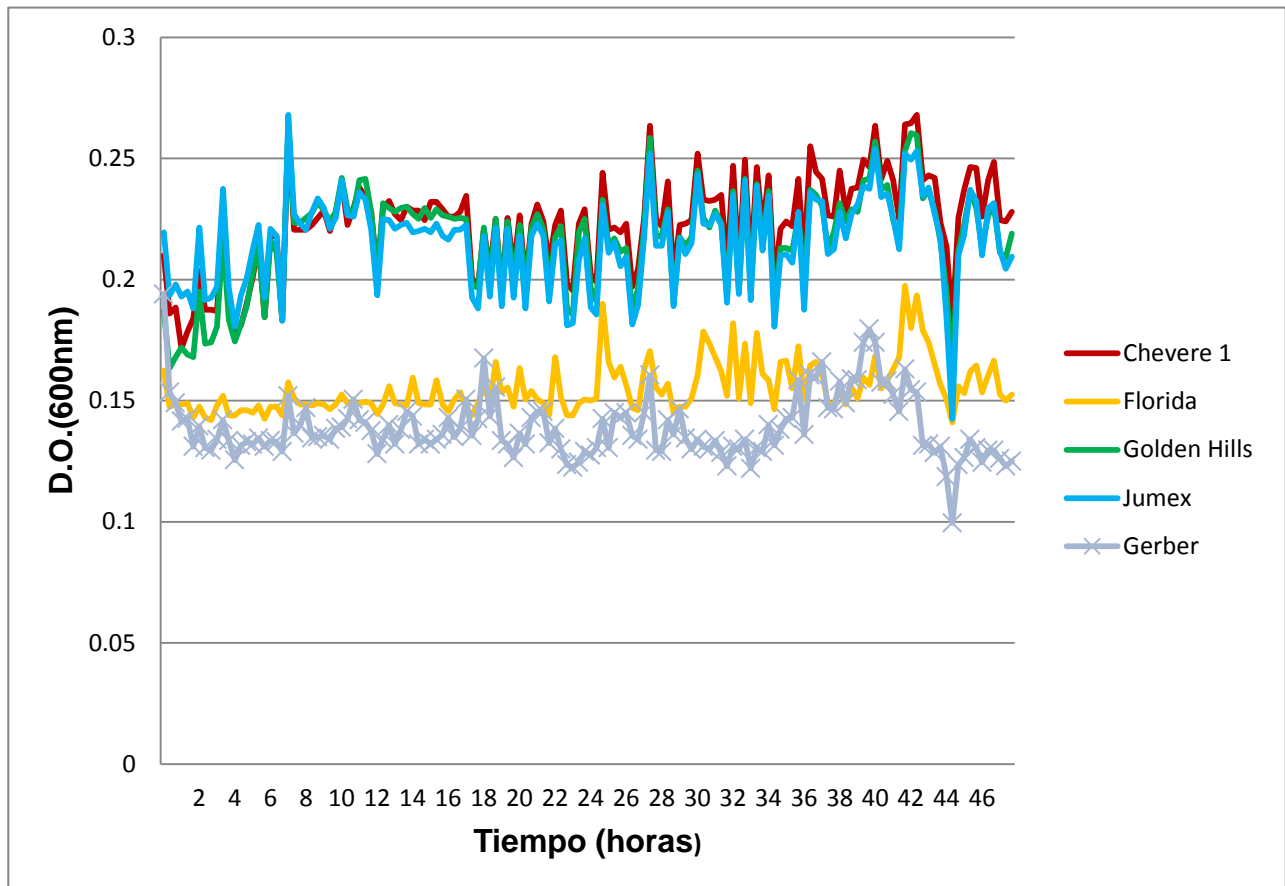


Figura 8. Dinámica de crecimiento de la bacteria ácido láctica 54 en 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores (pH 3.5) a 30°C por 48 horas.

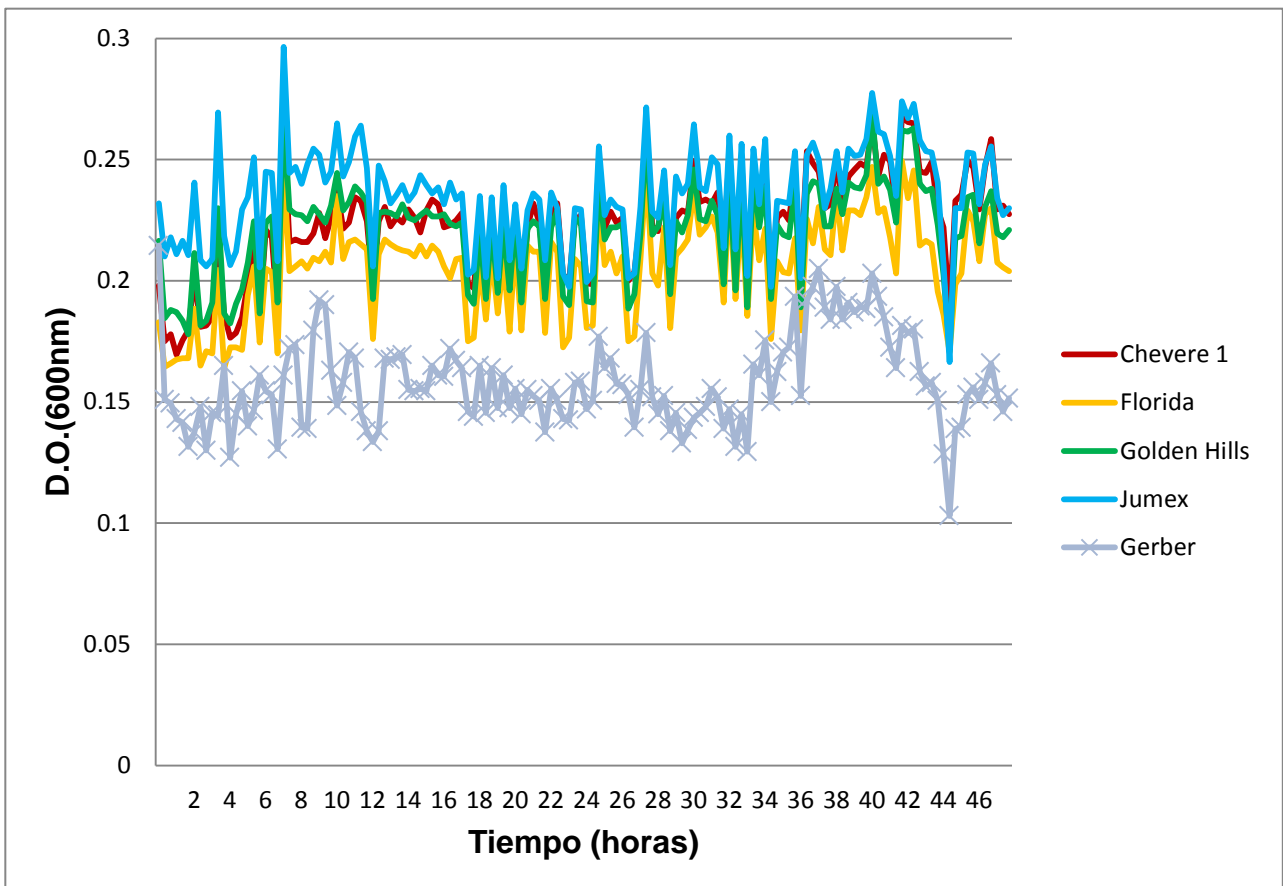


Figura 9. Dinámica de crecimiento de la bacteria ácido láctica 55 en 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores (pH 3.5) a 30°C por 48 horas.

Al no estar presentes levaduras en los jugos analizados, se procedió a evaluar el desarrollo de levaduras (*Sacchamomyces cerevisiae*, *Saccharomyces Bayanus*, levadura H11) y de bacterias lácticas (*Leuconostoc spp*) seleccionadas del cepario del Laboratorio Inocuidad Microbiana de los Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

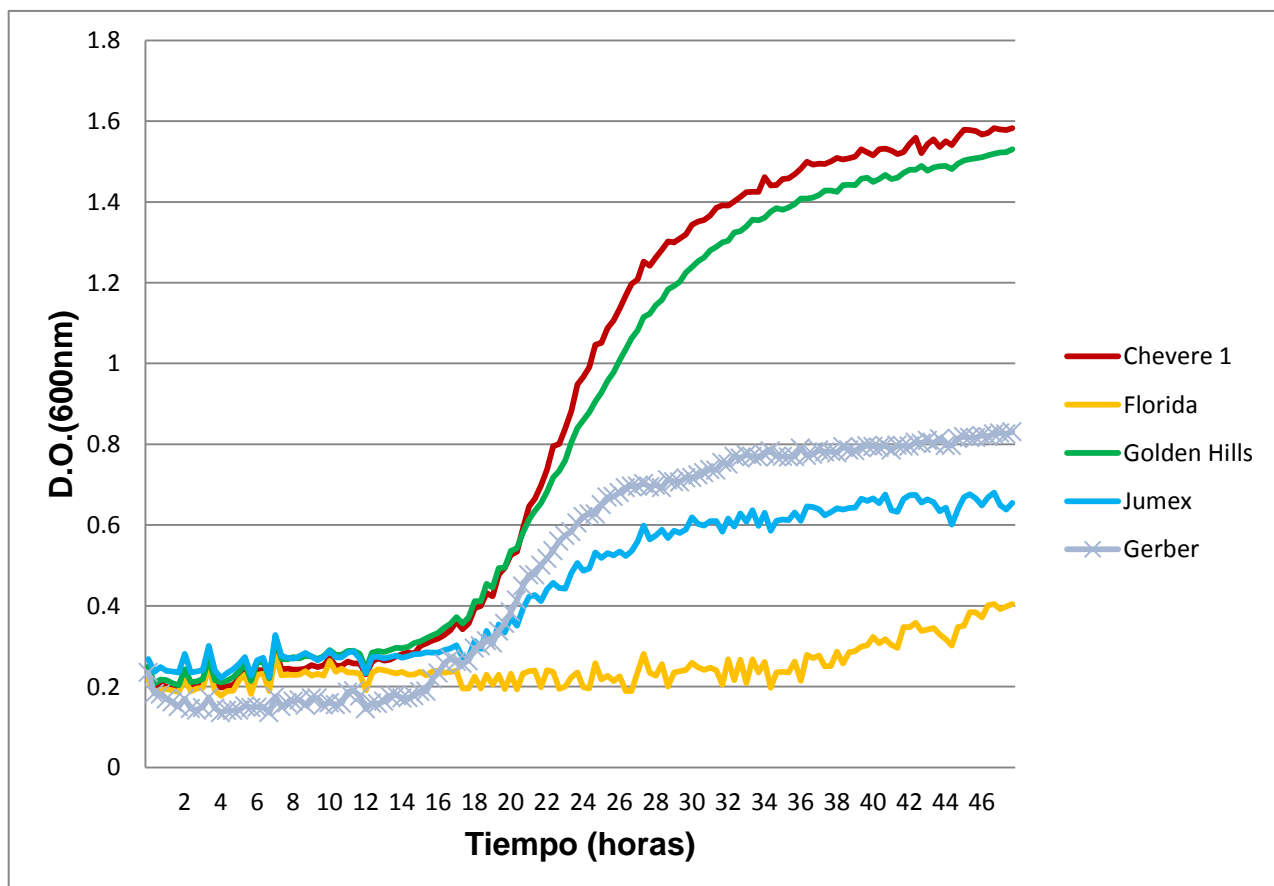


Figura 10. Dinámica de crecimiento de la levadura H11 en 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores (pH 3.5) a 30°C por 48 horas.

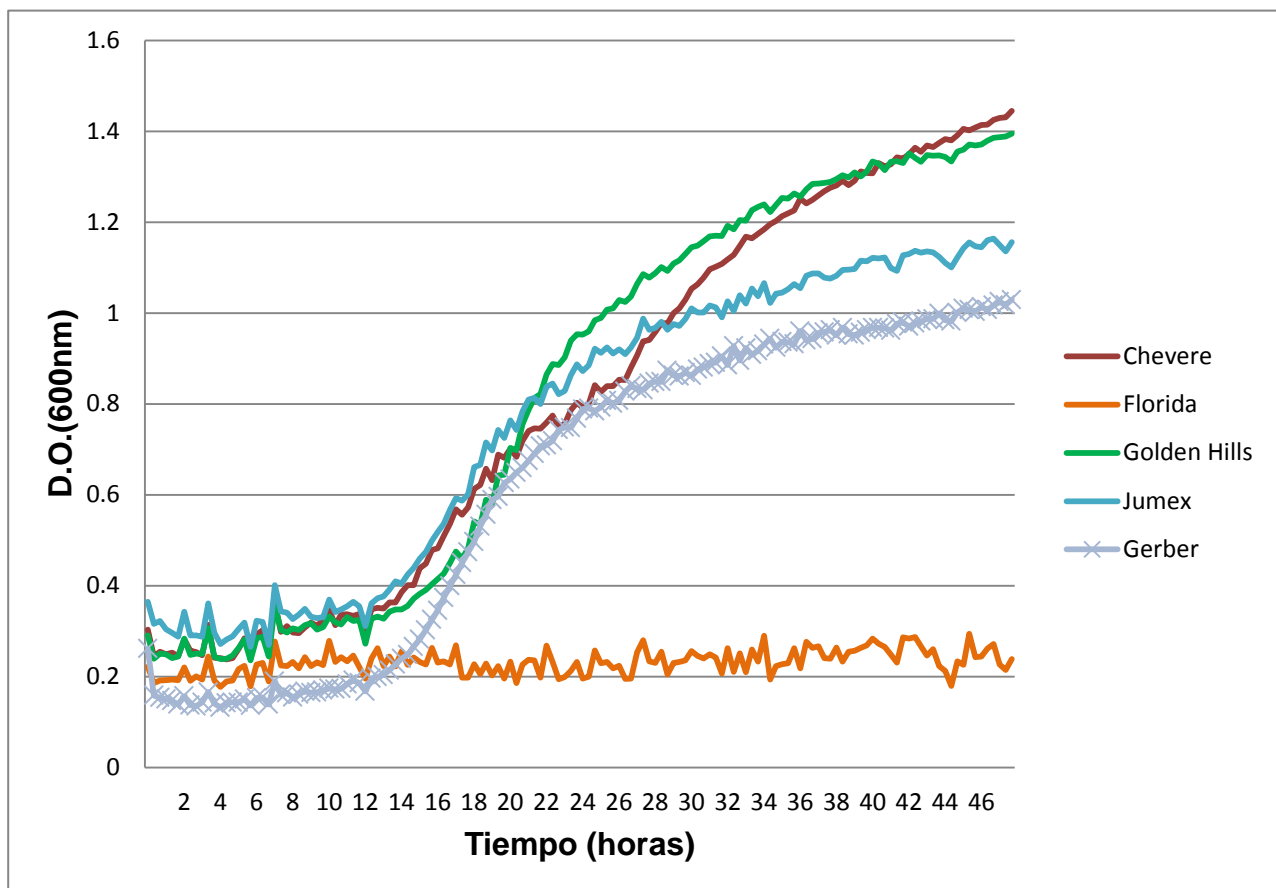


Figura 11. Dinámica de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores (pH 3.5) a 30°C por 48 horas.

Las dinámicas de crecimientos de la levadura H11 y *Saccharomyces cerevisiae* que se muestran en las figuras 10 y 11 respectivamente, desarrollaron en la mayoría de los jugos analizados demostrando la capacidad deterioradora de dichos microorganismos; cabe mencionar que en la marca Florida el desarrollo presentado por ambos microorganismos fue mínimo. Mientras que la levadura

Saccharomyces Bayanus mostró un comportamiento similar en todos los jugos analizados con un desarrollo escaso lo cual se puede apreciar en la Figura 12.

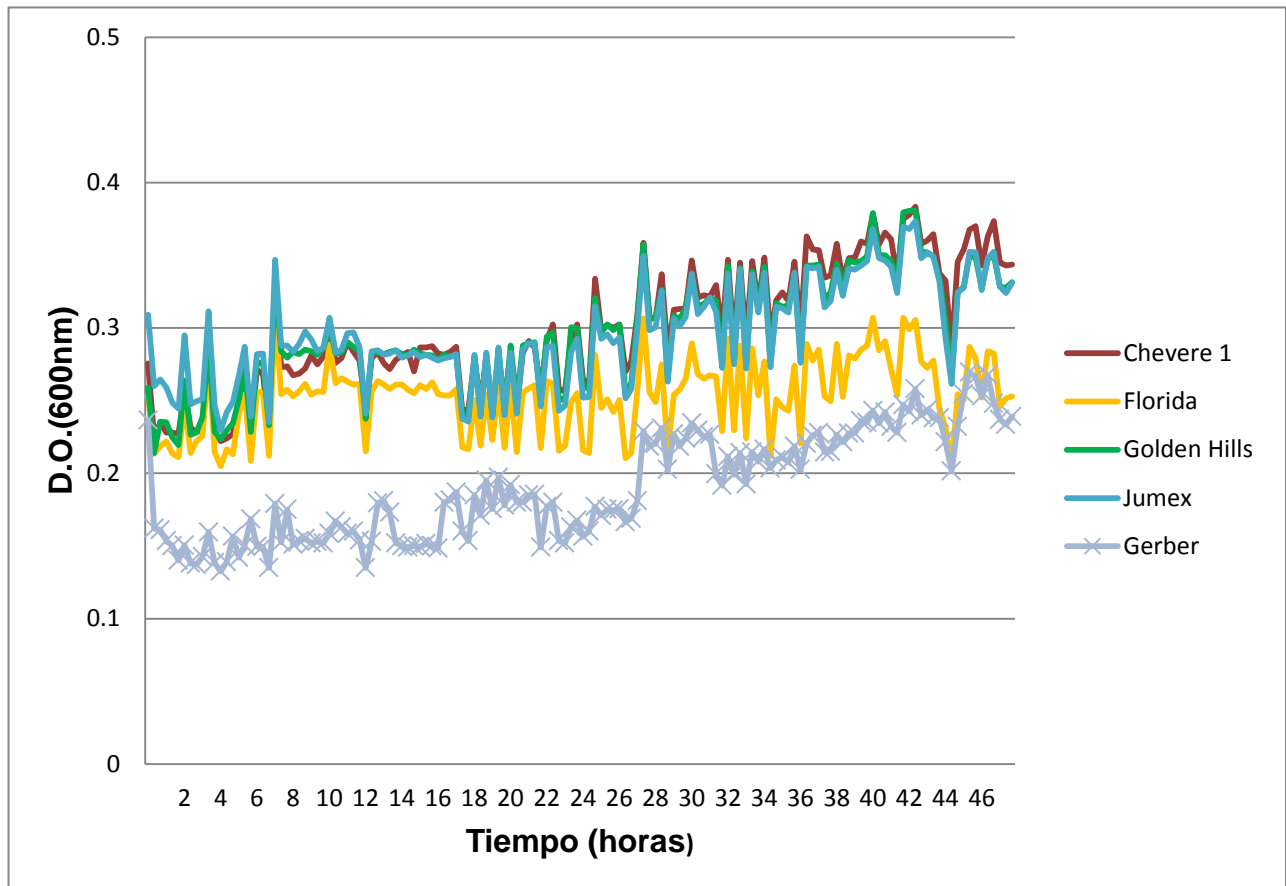


Figura 12. Dinámica de crecimiento de *Saccharomyces Bayanus* en 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores (pH 3.5) a 30°C por 48 horas.

Posteriormente se llevó a cabo la evaluación del desarrollo de *Leuconostoc* spp en los jugos de manzana, el cual presentó poco desarrollo en las muestras analizadas.

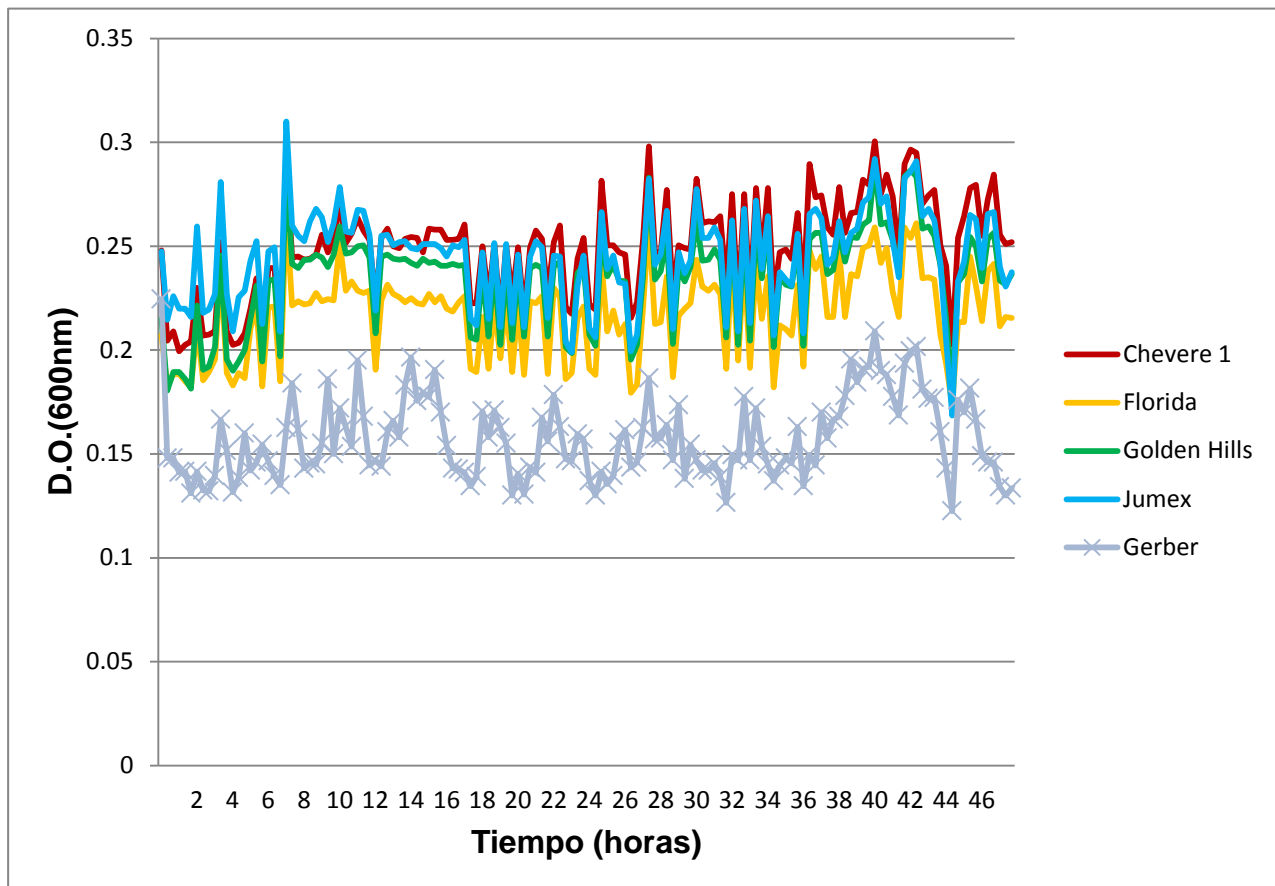


Figura 13. Dinámica de crecimiento de *Leuconostoc* spp en 5 marcas de jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores (pH 3.5) a 30°C por 48 horas.

4.3. Efecto de la aplicación de ondas de choque sobre *Leuconostoc* spp. y *Saccharomyces cerevisiae* en solución salina y jugo de manzana clarificado comercial.

En este estudio se evaluó la influencia de las ondas de choque en la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae* y *Leuconostoc* spp. Se evaluó el número de ondas de choque aplicadas a las suspensiones celulares, así como la presencia y ausencia

de luz visible y UV generada y la cavitación. Además de la luz que se genera al producirse la onda de choque se genera cavitación que es la formación y el colapso de burbujas en el fluido. Esto es debido a que se producen fluctuaciones de presión generada por la onda de choque, en el colapso de estas burbujas se generan ondas de choque secundarias así como un aumento de temperatura focalizada y micro jets de líquido. Esto se realizó en solución salina y en jugo de manzana clarificado comercial. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente de entre 22 - 25 °C.

4.3.1. Efecto de la aplicación de ondas de choque sobre *Leuconostoc* spp. y *S. cerevisiae* en solución salina

Los microorganismos a estudiar suspendidos en solución salina se colocaron en la pipeta de transferencia dejando un espacio de aire en la parte superior para favorecer la cavitación. Después se colocaron en el punto focal del Mexilit II y se aplicaron los tratamientos (150 y 350 ondas de choque) bloqueando y no bloqueando la radiación proveniente de la descarga eléctrica.

Cuando se aplicaron 150 ondas de choque en ausencia de luz en el caso de *Saccharomyces cerevisiae* la inactivación fue de 0.23 logaritmos; pero al aplicar 150 ondas de choque con presencia de luz la reducción fue cercana a 1 log UFC/ml (Figura 14). Al mismo microorganismo se le aplicaron 350 ondas de choque en ausencia de luz y se encontró una reducción similar al tratamiento de 150 ondas de choque en ausencia de luz, en contraste con el tratamiento de 350 ondas de choque con presencia de luz se logró una reducción logarítmica de 1. En el caso de *Leuconostoc* los tratamientos de 150 y 350 ondas de choque en ausencia de luz no produjeron una reducción considerable. En contraste cuando se aplicaron 150 y 350 ondas de choque en presencia de luz, las reducciones fueron de 0.72 y 3.65 log UFC/ml respectivamente.

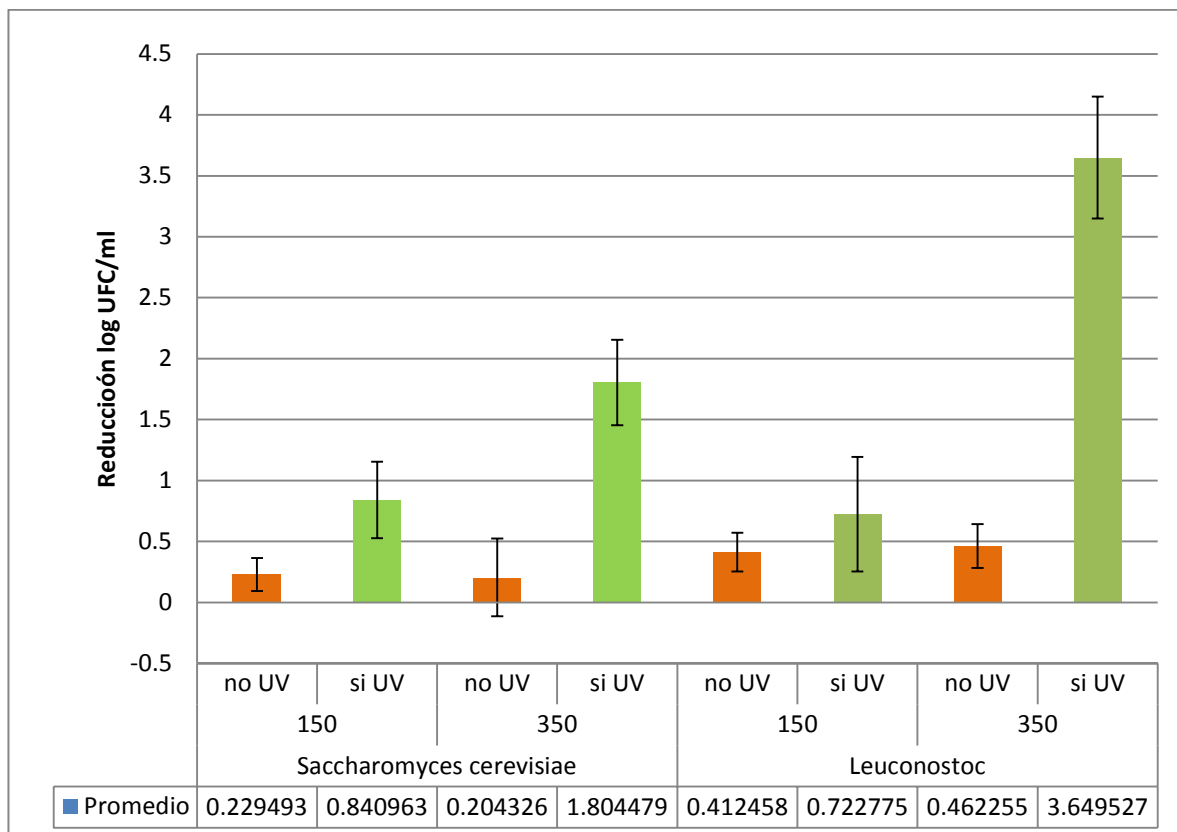


Figura 14. Efecto del número de ondas de choque y luz generada en *Leuconostoc* spp. y *Saccharomyces cerevisiae* resuspendidos en solución salina isotónica.

Cuadro 3. Análisis de varianza del efecto de luz, dosis de ondas de choque y microorganismo sobre la inactivación lograda.

	GL _{num}	GL _{den}	Valor F	p>F
Ordenada	1	13	31.25	8.8e-05
Luz	1	13	144.28	2.1e-08
Dosis	1	13	33.35	6.4e-05
Microorganismo	1	13	11.54	0.027
Luz: Dosis	1	13	35.6	4.7e-05
Luz: Microorganismo	1	13	3.63	0.079
Dosis: Microorganismo	1	13	8.84	0.011

Aunque las interacciones entre los factores fueron estadísticamente significativas, el factor con mayor influencia fue la radiación (Cuadro 3). En presencia de radiación y con la dosis de ondas de choque más alta se logró la reducción más alta para los dos microorganismos. Sin embargo, la susceptibilidad a las ondas de choque es más marcada en *Leuconostoc*.

4.3.2. Influencia del número de impulsos de ondas de choque sobre *Leuconostoc* spp. y *Saccharomyces cerevisiae* resuspendidos en jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores.

En este estudio, se evaluó la actividad bactericida de las ondas de choque en jugo de manzana clarificado comercial sin conservadores, en función del número de impulsos de ondas de choque y la presencia y ausencia de la radiación visible y UV producida por la forma en que se genera la onda de choque (electrohidráulica).

Cuando se aplicó el tratamiento de ondas de choque a las suspensiones celulares de *S.cerevisiae* y *Leuconostoc* contenidas en jugo de manzana, la reducción que se esperaba no fue la misma que se encontró cuando se aplicó el tratamiento en solución salina, se trabajó con 1000 ondas de choque con el fin de lograr una mayor inactivación de los microorganismos pero el comportamiento no fue el que se esperaba la inactivación no fue significativa en ambos microorganismos.

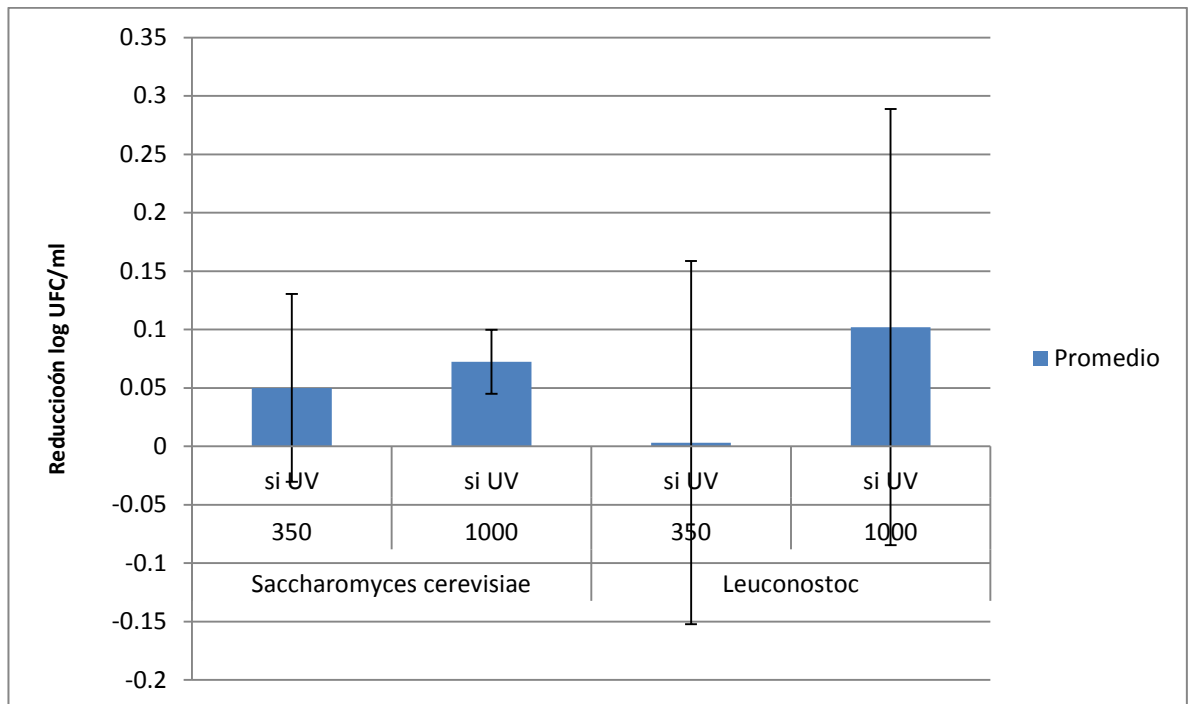


Figura 15. Efecto del número de ondas de choque y luz generada en *Leuconostoc* spp. y *Saccharomyces cerevisiae* resuspendidos en jugo de manzana.

5 DISCUSIÓN

Las levaduras y bacterias lácticas (BAL), son contaminantes comunes de jugos y concentrados de frutas y representan un problema importante para las industrias que procesan frutas o productos derivados. El bajo pH y alto contenido de azúcares de estos productos favorecen el desarrollo de las levaduras y BAL, que en consecuencia alteran la calidad del producto.

El pH bajo tiene un efecto directo en la selección de los microorganismos viables en el producto final, y en el tipo de flora predominante: levaduras, hongos y bacterias acidúricas, entre las que destacan las bacterias lácticas. Mientras éstas últimas tienen una tasa de desarrollo mayor, los hongos son más tolerantes a las altas concentraciones de azúcares. También, el tipo de producto influye en la selección o actividad de los microorganismos. Por ejemplo, las levaduras constituyen el problema de mayor importancia en ciertos jugos como los de uva y manzana. Más prominentes como acidúricos son algunos miembros del género *Bacillus* (*B. coagulans*, *B. licheniformis* y *B. polymyxa*) que son capaces de fermentar y deteriorar jugos empacados considerados termoestables (Fernández, 2000).

Al encontrar microorganismos en los jugos analizados nos indica que a pesar de los tratamientos térmicos y otras barreras como el pH bajo de este tipo de producto, hay algunos que logran adaptarse y sobrevivir bajo estas condiciones y en muchas ocasiones son los responsables de la alteración de la calidad del producto final.

Las levaduras *Sacharomyces cerevisiae* y la levadura H11 desarrollaron muy bien en la mayoría de los jugos empleados. Estos microorganismos toleran una concentración alta de azúcares y un bajo pH, por lo que podemos decir que son microorganismos que podrían provocar el deterioro de los jugos de manzana. En cambio la levadura *Sacharomyces Bayanus*, no presentó un buen desarrollo en los jugos lo que nos indica que no tolera el pH bajo de los jugos o no tolera la

concentración de azúcares presentes. Las BAL encontradas en los jugos de manzana analizados presentaron un desarrollo muy escaso en el jugo de manzana.

Una vez seleccionados los microorganismos con los que se trabajó se aplicaron los tratamientos de 150 y 350 ondas de choque con ausencia y presencia de radiación. La reducción es significativa sólo cuando se expone la suspensión celular a la radiación generada por las descargas eléctricas que generan a las ondas de choque. Este comportamiento fue similar en el caso de los dos microorganismos estudiados. Las células más grandes como las levaduras (5 a 10 μm) son más susceptibles a los efectos de la cavitación porque tienen una mayor superficie donde impacten las ondas de choque secundarias y los micro jets, además de que las células Gram positivas son las más resistentes a la cavitación que las bacterias Gram negativas debido a la capa adicional de peptidoglicanos que contienen (Earnshaw ,1998). Todos estos fenómenos secundarios pueden provocar daño severo a las paredes celulares y generar inactivación de los microorganismos. Otra observación al momento de realizar el tratamiento en el caso de la levadura *S. cerevisiae*, fue que al aplicar las ondas de choque se formaba un sedimento es decir se aglomeraban las levaduras presentes en la muestra. Esto puede ser una explicación de por qué se tuvo poca inactivación para este microorganismo; lo cual nos deja con la hipótesis que el jugo de manzana protege de alguna manera a los microorganismos cuando se aplican las ondas de choque. Además entre la solución salina y el jugo de manzana hay una gran diferencia en cuanto a nutrientes que los microorganismos estudiados pudieran utilizar para reparar el daño que se les pudo haber causado por las ondas de choque. Otra diferencia es la coloración café del jugo de manzana que impide que la luz visible y UV generada por la bujía penetre en toda la muestra. Esto se demostró al aplicar el mismo número de ondas de choque a la solución salina que es transparente. La inactivación de los microorganismos estudiados fue considerablemente distinta en los dos medios empleados.

6 CONCLUSIÓN

- Se analizaron las características fisicoquímicas de los jugos de manzana encontrándose que algunas marcas analizadas están por debajo de las normas internacionales.
- Se evaluó el desarrollo de los microorganismos aislados de los jugos de manzana, lo cual nos demostró que el tratamiento térmico empleado para asegurar la calidad microbiológica funciona en la mayoría de los microorganismos mientras que otros logran sobrevivir y adaptarse alterando la calidad del producto final.
- El tratamiento de 150 y 350 ondas de choque en solución salina en ausencia de luz visible y radiación UV no inactivó los dos microorganismos analizados de manera significativa.
- En solución salina el tratamiento de 150 y 350 ondas de choque en presencia de luz visible y radiación UV dio resultados considerables en la reducción de los microorganismos estudiados siendo *Leuconostoc* spp el más sensible a los tratamientos.
- El tratamiento de 350 y 1000 ondas de choque en presencia de luz visible y radiación UV en jugo de manzana arrojó resultados inesperados; la reducción de *Leuconostoc* y *S.Cerevisiae* fue casi nula; dejándonos con la hipótesis de que el jugo de manzana protege de alguna manera a los microorganismos.
- De acuerdo con los resultados obtenidos, vale la pena explorar la aplicación de ondas de choque en combinación con otros métodos de conservación.

7 REFERENCIAS

- Alvarez U**, Loske A, Tostado E, Prieto F. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* by underwater shock waves. Innovative Food Science & Emerging Technologies. **2004**;5:460.
- Anderson D**. Fundamentals of Aerodynamics. Maryland: 3rd Edition. McGraw-Hill, **2001**: 456-457.
- AOAC**. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC: 15 edición, **1990**.
- Ashurst R**. Producción y envasado de zumos y bebidas de frutas sin gas. España: Editorial Acribia, S.A, **1995**:67-70.
- Beech W**, Carr G. Economic Microbiology, Alcoholic Beverages. Londres: Academic press, **1977**: 139-313.
- Beech W**. The yeast, yeast Technology. Segunda edición. Londres: Academic Press, **1993**: 169-213.
- Bou G**, Saleta L, Sáez A, Tomás M, Valdezate S, Sousa D, Lueiro F, Villanueva R. Nosocomial outbreaks caused by *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*. Emerging Infectious Diseases. **2008**; 14:968-970.
- CODEX STAN 247-2005**. Norma General del CODEX para zumos (jugos) y néctares de frutas. 2005. Consultado el 5 de mayo del **2013**
- COMACIR**. COLEGIO DE ORTOPEDIA, MEDICOS ARTROSCOPISTAS Y CIRUJANOS DE RODILLA. Revista latinoamericana de artroscopia y traumatología del deporte. Rev. Med. SETRADE **2007**; 04: 9-20.
- CRFSFS**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Effect preservation technologies on microbial inactivation in foods. **2003**;2:42-45.
- Deak T**, Beuchat R. Yeasts associated with fruit juice concentrates. Journal Food Prot. **1993**; 56:777-782.
- Earnshaw R**. Ultrasound: a new opportunity for food preservation. London, UK: Blanckie Academic & Professional, **1998**:183.
- Eisele T**, Drake S. The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties. J of Food Composition and Analysis. 2004 18: 213-221.

Fernández E. Microbiología e inocuidad de los alimentos. Segunda edición. México: Universidad Autónoma de Querétaro, **2008**: 678-683.

Ingraham J, Ingraham C. Introducción a la microbiología .Barcelona: Editorial Reverté, S.A, **1998**:736.

Jay J. Modern Food Microbiology. Maryland: 5th edition. Chapman & Hall, **1992**: 38-66.

Johannin G, Smeier S, McFeeters R, Fleming P, Thompson L. Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter culture on fermentation of cabbage with reduced salt concentrations. Journal Food Microbiology and Safety. **2007**; 72: 166-172.

JUGOSA, Proceso industrial. Descripción de los procesos S.A. 2006. http://www.e-seia.cl/archivos/3ab_Anexos_07_03_07.pdf. Consultado el 19 de mayo del **2013**

Laguado N, Pérez E, Alvarado C. Características físico-químicas y fisiológicas de frutos de guayaba de los tipos Criolla roja y San Miguel procedentes de dos plantaciones comerciales. Rev. Fac. Agron. **1999**; 4: 382-397.

Loske A, Álvarez U, Galicia C, Tostado E, Prieto F. Bactericidal effect of underwater shock waves on *Escherichia coli* ATCC 10536 suspensions. Innovative Food Science & Emerging Technologies. **2002**; 3: 321-323.

Loske A, Álvarez U, Ramirez A, Fernández F, Méndez A. The influence of single-pulse and tandem shock wave on bacteria. Shock Waves. **2008**;17:441-443.

Maraver J, Moreno I, Cameán M. Irradiación de los alimentos. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, **2012**: 623-626.

Marx G, Moody A, Bermúdez D. A comparative study on the structure of *Saccharomyces cerevisiae* under nonthermal technologies: high hydrostatic pressure, pulsed electric fields and thermosonication. International Journal of Food Microbiology.**2011**;151:327-329.

Nieto H.Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Biotecnología. **2009**:12-13.

Norma Mexicana.NMX-F-045-1982. Alimentos. Frutas y derivados. Jugo de manzana. Consultado el 5 de mayo del **2013**.

Osorio F, Torres R, Bas M. Tratamiento de aguas para la eliminación de microorganismo y agentes contaminantes. España: Ediciones Díaz de Santos,**2010**:101-102.

Parish M, Higgins D. Yeast and molds isolated from spoiling citrus products and by products. Journal Food Prot. **1989**; 52: 261-263.

Raventos S. Industria alimentaria tecnologías emergentes. Barcelona: Edicions UPC, **2003**:25-26.

Rodríguez R. Desarrollo y validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos. Universidad de Cordoba. Tesis para obtener el título de Doctor en veterinaria. **2003**:60-65.

SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Consumo industrial de la guayaba 2010. http://w4.siap.sagarpa.gob.mx/sispro/IndModelos/SP_AG/Guayaba/Industria.pdf Consultado el 1 de mayo del **2013**.

Yuste J, Fung D. Evaluation of Salmonella Typhimurium, Yersinia enterocolitica and Staphylococcus aureus counts in apple juice with cinnamon, by conventional media and thin agar layer method. Food Microbiology. **2003**; 20: 365-370.

Zúñiga E. Aislamiento de *Leuconostoc* spp con capacidad para deteriorar jamón cocido, rebanado y empacado al vacío, y su inactivación mediante alta presión hidrostática y ondas de choque. Universidad Autónoma de Querétaro, Qro. Tesis para obtener el título de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. **2012**:34-35.